

**This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

**Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.**

**Defects in the images may include (but are not limited to):**

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORLED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平7-507210

第1部門第1区分

(43)公表日 平成7年(1995)8月10日

(51)Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I
C 1 2 P 21/08		9161-4B	
C 0 7 K 16/26		8318-4H	
G 0 1 N 33/53	D	7055-2J	
/ C 1 2 N 15/02			
	9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	C
	審査請求 未請求	予備審査請求 有	(全 6 頁) 最終頁に続く

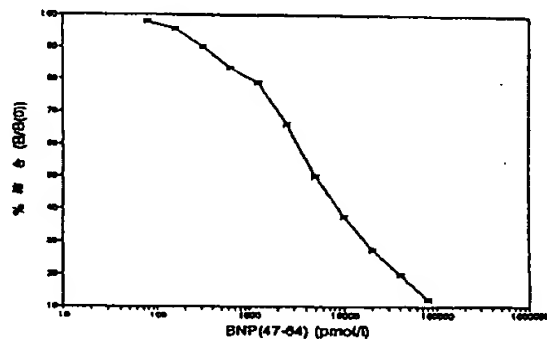
(21)出願番号 特願平6-500364  
 (86) (22)出願日 平成5年(1993)6月2日  
 (85)翻訳文提出日 平成6年(1994)12月2日  
 (86)国際出願番号 PCT/GB93/01173  
 (87)国際公開番号 WO93/24531  
 (87)国際公開日 平成5年(1993)12月9日  
 (31)優先権主張番号 9211686. 2  
 (32)優先日 1992年6月3日  
 (33)優先権主張国 イギリス (GB)  
 (81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, CA, JP, US

(71)出願人 メディノーヴァ エスエフ  
 ノールウェー オスロ エヌー0027 リク  
 スホスピタレート  
 (72)発明者 ホール, クリスチアン  
 ノールウェー スナローワ 1335 フュル  
 ストリア 258  
 (74)代理人 弁理士 鈴木 俊一郎

(54)【発明の名称】 BNP抗体およびこれを用いる免疫アッセイ

## (57)【要約】

本発明は、N-末端脳ナトリウム排泄増加因子のアミノ酸1-76、即ちBNP(1-76)を含むポリペプチドに特異的な抗体である、免疫アッセイ方法に使用するための抗体を提供する。また、BNP(1-76)が診断上または予知上の指示物である場合の状態、例えば心不全または血容量増加症を診断または予知するための方法およびキットを提供する。



## 特表平7-507210 (2)

### 請求の範囲

1. 脳室増大ナトリウム排泄増加因子のアミノ酸 1-76、即ち BNP(1-76)を含むポリペプチドに特異的な抗体である、免疫アッセイ方法に使用するための抗体。
2. モノクローナル抗体である、請求項1に記載の抗体。
3. ポリクローナル抗体である、請求項1に記載の抗体。
4. 標識を有する、請求項1～3の何れかに記載の抗体。
5. 前記の標識が、放射性核種、蛍光性物質、酵素、色素または着色粒子である、請求項1に記載の抗体。
6. 固定化された形態にある、請求項1～5の何れかに記載の抗体。
7. BNP(1-76)あるいはそのフラグメントまたはそのポリペプチド延長物に対する第1結合性パートナーが、請求項1～6の何れかに記載のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、BNP(1-76)あるいはそのフラグメントまたはそのポリペプチド延長物の免疫アッセイ方法。
8. 前記の抗体が、マイクロタイタープレート、膜またはビーズに固定化されている、請求項7に記載の方法。
9. BNP(1-76)に対する第2抗体をサンドイッチアッセイにおいて用い、この抗体を BNP(1-76)との反応前または反応後に標識する、請求項7に記載の方法。

は予知する方法。

15. BNP(1-76)あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延長物を、所望により免疫原性のタンパク質またはポリペプチドに結合して、宿主動物に注射し、ポリクローナル抗体を含む血清を提供するか、あるいは次いでハイブリドーマに導入される脾臓細胞、またはモノクローナル抗体を産生する永続化セルラインを提供することからなる、請求項1に記載の抗体の製造方法。

10. 被分析物溶液に、標識された BNP(1-76)あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延長物の既知量を加え、そして BNP(1-76)に対する固定化抗体の固定量と接触させて競合的結合アッセイを提供する、請求項9に記載の方法。
11. 標識された BNP(1-76)あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延長物。
12. 1つまたはそれ以上の免疫原性ポリペプチドに結合された BNP(1-76)あるいはその免疫原性フラグメントまたは BNP(1-76)の少なくとも1つのエピトープを有するそのポリペプチド延長物。
13. 少なくとも
  - (a) 固定化された形態の、本発明のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を含む、所望により;
  - (b) BNP(1-76)あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延長物の標識されたサンプル;
  - (c) 固定化されていない形態の前記のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体;
  - (d) 前記の抗体(c)に特異的な標識された第2抗体を含む、BNP(1-76)あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延長物の免疫アッセイ用キット。
14. BNP(1-76)あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延長物の濃度が診断上または予知上の指示物である場合に、患者の体液をインビトロで免疫アッセイすることにより、体液中の BNP(1-76)の存在またはその量を検出またはアッセイすることからなる、前記のような状態を診断または予知する方法。

### 明 細 書

#### BNP抗体およびこれを用いる免疫アッセイ

本発明は、脳ナトリウム排泄増加ペプチドプロホルモン (Brain Natriuretic Peptide Prohormone) の B-末端セクション、即ち BNP(1-76)、およびこれに対する抗体を、生物学的研究の目的で、また医学的診断、例えば心不全または血容量増加を診断する目的で、生物学的免疫アッセイに使用する方法に関する。

心不全は、特に成人における一般的な臨床上の症候群である。人口調査によれば、この状態は西側諸国の総人口の約2%を占めていることが示されている。この症候群は、通常、非特異的症狀、例えば運動時呼吸困難、疲労および夜間頻尿を伴う進行性徴候を呈する。確実に診断するために、医師は通常、彼の臨床的経験を頼りにするか、あるいは超音波心臓動脈診断法、放射性核種検査法、運動試験またはカテテル法について、患者を心臓病学センターに搬送しなければならない。

心疾患は、多くの主要な国々における健康資源の重大な損失を及ぼしており、初期の診断は、病状を制御するために、かつ重篤な心不全に進行するのを防止するために役立つであろうが、心不全が起こりそうなこれらの患者を、心不全が実際に起こる前に同定できること、即ち診断よりは予知できることが好ましいことは、明らかであろう。

残念ながら、現在のところ、心不全の可能性を予知するための完全な満足すべき方法はない。このような方法に關してしばしば懸念される問題は、精度および感度が不十分であることであり、また、特別に訓練された職員（例えば超音波心臓断層写真の場合）が必要な高価な設備を必要とする点で不利なことである。従って、正確にかつ高感度で、心不全の病状を診断できるのみならず、心不全が発病する可能性をも予知できる簡単な方法に対する要望がある。

心不全は、徴候的な状態、即ち明白な病型または症候群と定義することができ、患者はしばしば、心臓不全それ自体が覆れる前に明白な症状のない

非徴候的 (asymptomatic) 心臓不全の状態、即ち臨床的 (sub-clinical) 状態を通過することがある。しかしながら、本発明者は、心臓不全患者の全てが真実な心不全に進行し続けるのではないこと、また、このような人々の狭い範囲に於いては、他の人々よりも心不全の危険が極めて大きいことを見出した。心不全が進行する特別な危険のある人々を、心不全が起こる前に検出でき、治療するために、これらの人々を特定できることは、臨床上の重要性が大きいだろう。現在行なわれている処置、例えば ACE 阻害剤は極めて高価であり、心不全の発病を防止しようとして処置すべき全ての人々にとって、無益ではある。

脳ナトリウム排泄増加ペプチド (BNP) は、初めは T. Sudoh および共同研究者によって脳から単離されたポリペプチドである (Mature 1988; 332; 78-81)。このペプチドをコードする cDNA のクローニングおよび配列分析 (T. Sudoh BMR 1989; 159; 1427-34) の後、BNP はヒト心臓において産生されることが示された。ヒト脳ナトリウム排泄増加ペプチドは、心筋細胞中でプロホルモン (proBNP または BNP(1-108)) として産生されると信じられている。proBNP は、108 個のアミノ酸からなり、分泌の前またはその間に、アミノ酸 Arg76 -- Ser77 において開裂して、BNP と、BNP(1-76) となり、この BNP(1-76) は、proBNP の N-末端からの最初の 76 個のアミノ酸からなるペプチドである。

BNP(77-108) の血漿濃度は、心臓不全患者において増加し、心不全を来す。心筋細胞は他の因子、即ち心房ナトリウム排泄増加因子 (ANP) を分泌するが、心不全または初期心不全に対する分泌応答は、ANP 系と比較して、BNP 系において遙に大きいようである (Nukoyama et al, J Clin Invest 1991; 87; 1402-12)。

本発明は、BNP(1-76) が、BNP ホルモン自体と比較して半減期が長く、かつ濃度が高いため、心臓病としての血漿増加の診断上の特に良好な指示物または予知物であるという概念に基づいている。

従って BNP(1-76) は、心不全の診断試験または予知試験の基盤を提供する

あるならば、検出された第 2 抗体は、抗-マウス抗体または抗-ウサギ抗体であってよい。

好適な標識としては、放射性核種、蛍光性物質、例えばユーロビウムを基盤とする蛍光性物質、酵素、例えば酵素ハイブリッド化法を用いる ELISA 系に使用されるような酵素、あるいは色素または着色粒子、例えばコロイド白金などが挙げられる。

あるいは、競合的結合アッセイを用いることもでき、この場合は、検出された BNP(1-76) あるいはそのフラグメントまたは延長物の既知量を、被分析物 (analyte) の溶液に加え、固定化モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の固定量と接触させ、これによって、固定化された (反応した) 標識抗原の量は、被分析物中に存在する標的抗原の量に反比例する。

従って本発明は、BNP(1-76) あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延長物の標識された形態、および本発明の抗体の標識された形態にまで拡張される。

本発明はまた、少なくとも

- (a) 固定化された形態の、本発明のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を含み、所望により、
- (b) BNP(1-76) あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延長物の標識されたサンプル、
- (c) 固定化されていない形態の上記のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、
- (d) 上記の抗体 (c) に特異的な標識された第 2 抗体

を含む、BNP(1-76) あるいはそのフラグメントまたはそのポリペプチド延長物の免疫アッセイ用キットを包含する。

このような免疫アッセイおよびキットは、関連する生物学的システムの研究において、並びに血液中の BNP(1-76) レベルが診断上または予知上の指示物である場合の状態を診断または予知するために使用することができる。

本発明はまた、BNP(1-76) あるいはそのフラグメントまたはポリペプチド延

ために、本来このような試験用の抗体の生物合成に使用できるだけでなく、競合的結合性免疫アッセイにおける結合性抗原としても使用することができる。抗体を作成する際にこのように使用するためには、BNP(1-76) またはそのフラグメントを、有利には、免疫原性のタンパク質またはペプチド、例えばツベルクリンのタンパク質誘導体である PPD、アオガイヘモシアニン (Keyhole Limpet Haemocyanin) またはウシ血清アルブミンと結合させることができる。

従って、1つまたはそれ以上の免疫原性ポリペプチドに結合された BNP(1-76) あるいはその抗原性フラグメントまたは BNP(1-76) の少なくとも 1 つの抗原性エピトープを有するそのポリペプチド延長物は、本発明の一つの態様を構成する。これらのポリペプチドは、BNP(1-76) に特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体の作成に用いることができる。このようなモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体は、本発明のもう二つの態様を構成する。

本発明の更にもう一つの態様によれば、BNP(1-76) あるいはその抗原性フラグメントまたは BNP(1-76) の少なくとも 1 つの抗原性エピトープを有するそのポリペプチド延長物についての免疫アッセイ方法が提供され、この場合、その第 1 結合性パートナーは、本発明のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である。免疫アッセイ方法は、この技術分野でよく知られていることは言うまでもなく、例えば RIA、ELISA、蛍光免疫アッセイ (FLA) または乾式化学試験ストリップ免疫アッセイである。このような免疫アッセイでは、一般的に、本発明のモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体が、例えばマイクロタイタープレート、膜またはビーズに固定化された形で用いられ、標的の BNP(1-76) 化合物が単離される。サンドイッチアッセイでは、結合した抗原を、本発明の可溶性抗体を更に用いて標識することができ、この可溶性抗体は、モノクローナル性でもポリクローナル性でもよく、標識を有していてもよく、または更に好都合には、標識を有する第 2 抗体との反応によって、後でそれ自体を標識することもできる。

従って、本発明の第 1 抗体がマウスまたはウサギにおいて産生されたもので

長物の濃度が診断上または予知上の指示物である場合に、患者の体液をインビトロで免疫アッセイすることにより、体液中の BNP(1-76) の存在またはその量を検出またはアッセイすることからなる、上記のような状態を診断または予知する方法をも包含する。

本発明者は最近、他のナトリウム排泄増加因子、即ち pro-ANP および特に N-末端 pro-ANP を、心不全の明白な徴候のない患者における心不全の危険の指示物として使用できることを見出した。体液中の pro-ANP レベルは、心不全の危険に直接に関連づけることができ、主として高められた心室圧に関連づけることができる。これとは対照的に、BNP(1-76) は、主として高められた心室圧に関連する心臓の状態を示す。BNP(1-76) は、そのフラグメントまたはポリペプチド延長物として、実際の心不全の診断に使用できるのに加えて、心不全の危険を評価するためにも使用することができる。更に、体液中の N-末端 pro-ANP および BNP(1-76) の両者のアッセイは、心室圧または心室圧のどちらに関するのかを決定するのに役立つことができる。

従って、免疫アッセイは、心不全の危険の監視に使用することができる。このような処置は、心不全に見られる血漿増加および過剰な血管収縮を、利尿剤および血管拡張剤の投与によって減少させることを目的としている。このような処置は、心室圧の低下によって BNP(1-76) の心臓での産生を低下させるであろう。得られる血漿 BNP(1-76) 濃度の低下は、医師に薬剤の有意な効果を知らせるのに役立つ。その反対に、血漿 BNP(1-76) の上昇は、用量の調節が必要であるかもしれないことを示す。

現時点で文献に十分に記載されてはいないが、BNP(1-76) は、心不全を伴わない血漿増加の診断における診断手段としても使用することができる。このための免疫アッセイは、血漿状態の監視が不可欠な腎臓内臓治療の確立においても使用できる可能性を有している。

免疫アッセイが行なわれる体液は、BNP(1-76) が単離される任意の体液であってよいが、血液または血清が好都合であろう。幾つかの場合には、ペプチドを抽出するか、あるいはアッセイの前にサンプルを処理することが好都合なこ

とがある。

BMP(1-76)あるいはその抗原性または免疫原性フラグメントは、この分野でよく知られている技術を用いて、その構成アミノ酸から合成することにより、または予備合成されたアミノ酸ブロックを調製することにより製造することができる。標識された材料が必要な場合には、標準的な技術によって標識を導入することができる。

モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体を産生させる目的で、例えば1-エチル-3-(3-ジメチル-アミノプロピル)カルボジイミドを用いて、Staros et al.の方法 (Analyte Biochem 1986; 156: 220-222)に従って、BMP(1-76)またはそのフラグメントを、免疫原性のタンパク質またはペプチド、例えばツベルクリンのタンパク質調製物 PPD に結合させることができる。

本発明の抗体は、宿主動物、例えばマウスまたはウサギに、本発明の BMP 抗原、有利には前記のように免疫原性タンパク質に結合した抗原を注射して、ポリクローナル抗体を含有する血清を提供するか、あるいはハイブリドーマに選入するための脾臓細胞、またはモノクローナル抗体を産生する永続化セルラインを提供することによって作成することができる。

下記の実施例は、添付の図面を参照して説明するためにだけ記載する。

図1は、免疫原、標識物およびトレーサーとして合成 BMP(47-64)を用い、またポリクローナルウサギ抗体を用いる BMP(1-76)の免疫アッセイのための標準曲線を示す。(横軸は BMP(47-64) pmol/l を示し、縦軸は対結合 (2/B(0))を示す。)

#### 実施例1

BMP(1-76)に対するモノクローナル抗体の製造

##### 1) 結合

BMP(1-76)の3つの合成フラグメント: BMP(1-21)、BMP(22-46)および BMP(47-64)は、Peninsula 研究所から得られ、Staros et al. (Analyte

chem 1986; 156: 220-222)に従って、PPD (ツベルクリンのタンパク質調製物)に結合させた。

##### 2) 免疫操作

BCG 抗原で前免疫操作した Balb C マウスを用いた。これらのマウスに、フロインド不完全アジュバント 200  $\mu$ l 中の上記3種の結合物の混合物 50  $\mu$ g を接種した。この混合物は、2週間の間隔で2回、2  $\times$  200  $\mu$ l の注射として与えた。最後の注射から2週間後に、食糧水中の結合物の混合物 50  $\mu$ g を腹腔内に注射した。

##### 3) 融合

腹腔内免疫操作から3日後に、マウスの脾臓細胞を SP 2/O 骨髓腫細胞と融合させ、得られたハイブリドーマを BMT 培地において選別した。ハイブリドーマの懸濁液を、10  $\times$  のヒト内皮細胞上覆い液に富ませた 360個のウェル中のダルベッコ培地に飼いた。

##### 4) スクリーニング

###### 方法1

Costar マイクロタイタープレートに、合成 BMP ペプチド配列の混合物 (0.5  $\mu$ g/ml) で被覆した。次いで上澄み液を加え、上澄み液からの抗体の結合を、ELISA により、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ酵素に結合した抗マウス IgG の添加に次いで基質溶液 (OPD) を添加して、スクリーニングした。

###### 方法2

スクリーニングのもう一つの方法は、Greiner マイクロタイタープレートに、ヤギ抗マウス IgG (1.0  $\mu$ g/ml) で被覆することである。次いで上澄み液を加え、インキュベートする。ビオチニル結合合成 BMP ペプチド配列を加え、上

プレートリーダーで色を読みとる。

#### 実施例2

ポリクローナル抗ウサギ抗体を用いる BMP(1-76)の免疫アッセイ

BMP(1-76)の合成ペプチドサブ配列、この場合は BMP(47-64)を、Staros et al. (上記)に従って PPD に結合した。ウサギに BCG ワクチンを接種し、次いで前記の結合ペプチドで繰り返し免疫操作した。

B-細胞に付加したチロシン基による合成 BMP(47-64)の炭素化 (<sup>125</sup>I)を、クロラミン-T 法によって、下記のようにして行なった。

##### クロラミン-T 法

- 1) 5  $\mu$ g の合成ペプチドを、20  $\mu$ l の酢酸ナトリウム緩衝液 (0.25 M, pH 7.5) で再溶解した。
- 2) 約 5  $\mu$ l の <sup>125</sup>I を加えた (8.5 nCi)。
- 3) 5  $\mu$ l のクロラミン-T (1 mg/ml) を加え、45 秒間インキュベートした。
- 4) 5  $\mu$ l のメタ重亜硫酸ナトリウム (1 mg/ml) を加え、45 秒間インキュベートした。
- 5) 次いで混合物を Sephadex G10 のカラムで分別した。
- 6) フラクシオンをガンマカウンターでカウントし、1分当たりのカウント (cpm) が最高のフラクシオン (1つまたは2つ以上)を、RIA 法に使用するためのトレーサーとして選んだ。

サンプルまたは標準物 (BMP(47-64))を、トレーサー (炭素化 BMP(47-64))およびウサギ血清からのポリクローナル抗体と共に、ポリスチレン製アッセイ用チューブ中で混合する。4℃で 48 時間インキュベートした後、ウサギからの正常血清、およびヤギ抗-ウサギ IgG を加える。2時間インキュベートした後、ポリエチレングリコール (PEG) を加え、サンプルを遠心する。上澄み

液がペプチドに結合する能力を、ELISA により、ストレプトアビジン (streptavidin) に結合したホースラディッシュペーパーオキシダーゼ酵素の添加に次いで基質溶液 (OPD) を添加して、スクリーニングする。

##### 5) クローニング

ペプチド混合物に対する抗体を産生するハイブリドーマを、2系列でクローニングおよび継代クローニングした。クローン 1C7 は、ペプチド配列 BMP(47-64) どの反応を示した。このクローンを生育させ、上澄み液を BMP(1-76)の免疫アッセイに使用した。

#### 実施例3

BMP(1-76)の免疫アッセイ

1C7 抗体は、BMP(1-76)の種々のタイプの免疫アッセイに使用することができる。これらの免疫アッセイとしては、

- a) 放射線免疫アッセイ (RIA)
- b) ユーロビウム蛍光免疫アッセイ (FIA)
- c) マイクロタイタープレートまたは膜において行なわれる直接ハイブリッド法を含む酵素結合免疫ソープメントアッセイ (ELISA)
- d) 種々の乾式-化学試験ストリップ免疫アッセイ

が挙げられる。

下記にサンドイッチ ELISA の例を記載する。

Costar マイクロタイタープレートに、1C7 抗体で前被覆する。サンプルまたは標準物をウェルに加え、2時間インキュベートした後、ウェルを洗浄し、BMP(1-76)に対する第2抗体 (ポリクローナルまたはモノクローナル)を加える。再び2時間後に、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼで標識した抗マウス (ウサギ) 抗体を提供し、最後に、オフェニレンジアミン基質を加えた後、

度を除去し、比重量中の1分当たりのカウント (cpm) を、ガンマカウンターで測定する。このタイプのアッセイによって得られた標準曲線の一例を、図1に示す。

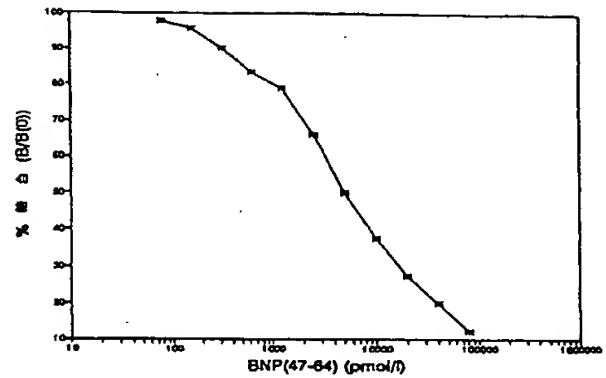


Figure 1

国際調査報告		PCT/GB 93/01173
1. CLASSIFICATION BY SUBJECT MATTER of the international patent document, indicating the		
Int.Cl. 5 C07K15/28; C07K21/00; C12P21/08; G01N33/53		
2. REFERENCE SIGNIFICANCE		
Int.Cl. 5 C07K 1 C12P 1 G01N		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Location of Document, if not otherwise, from abstracts, of the document referred to	Relevance to Claims
A	JAPANESE PATENT ABSTRACTS (UNEXAMINED) Section Ch. Week 9207, Derwent Publications Ltd., London, GB; Class CH. AM 92-053618 & JP.A.3 297 392 (SHIONOGI KK) 27 December 1991 see abstract	1-10
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 114, no. 25, 24 June 1991, Columbus, Ohio, US; abstract no. 240738A; TOSAKI, SAKUTOSHI ET AL. 'A specific and highly sensitive radioimmunoassay of human brain natriuretic peptide' page 108, column 1; & SHINKO SYOKI vol. 39, no. 3, 1991, JAPAN; pages 283 - 288 see abstract	1-10
<p>* Source of information or document referred to</p> <p>* A* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* B* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* C* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* D* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* E* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* F* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* G* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* H* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* I* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* J* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* K* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* L* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* M* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* N* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* O* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* P* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* Q* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* R* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* S* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* T* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* U* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* V* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* W* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* X* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* Y* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p> <p>* Z* Indicates whether the document is of the type which is not available to the public (e.g. unpublished)</p>		
<p>PP. 02/27/93/1000</p> <p>Date of the Search Conference or the International Search Report: 25 AUGUST 1993</p> <p>Date of filing of the International Search Report: 14-08-1993</p> <p>Examination Authority: CURBPLAN PATENT OFFICE</p> <p>Examiner of International Search: HODGIC K.</p>		

INTERNATIONAL PATENT ABSTRACT		PCT/GB 93/01173
1. CLASSIFICATION BY SUBJECT MATTER of the international patent document, indicating the		
Int.Cl. 5 C07K15/28; C07K21/00; C12P21/08; G01N33/53		
2. REFERENCE SIGNIFICANCE		
Int.Cl. 5 C07K 1 C12P 1 G01N		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Location of Document, if not otherwise, from abstracts, of the document referred to	Relevance to Claims
A	J. CLIN. INVEST. vol. 87, no. 4, April 1991, AM. SOC. CLIN. INVEST. pages 1402 - 1412 H. NUKIYAMA ET AL. 'Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans' cited in the application see page 1404, left column, paragraph 6 - page 1406, right column, paragraph 2	1-15
A	EP.A.0 385 476 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO.) 5 September 1990 see page 2, line 45 - page 3, line 3; claims 1-9	1-15

This report lists the subject Priority documents relating to the subject documents used in the above-mentioned international search report.  
The documents are as mentioned in the European Patent Office (EPO) file on:  
The European Patent Office is in no way liable for their particular status and merely gives for the purpose of information. 29/08/93

Priority documents used in search report	Publication date	Priority Number document	Publication date
EP-A-0186476	06-09-90	JP-A- 2231062	13-09-90
		JP-A- 2237999	20-09-90

For more details about this report : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/93

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>4</sup> 識別記号 庁内整理番号 F I  
(C 1 2 P 21/08  
C 1 2 R 1:91)